

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10143

研究課題名(和文)大規模ゲノムデータによるステージ - 大腸癌術後個別化バイオマーカーの作成と検証

研究課題名(英文)Development of biomarkers for stage II and III colorectal cancer

研究代表者

竹之下 誠一 (Takenoshita, Seiichi)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：10167489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：根治手術や術後補助化学療法などの標準治療でも、ステージ2-3大腸癌のうち15-30%は再発するとされる。本研究では、再発・癌死リスクの高いステージ2-3症例を抽出するバイオマーカーを検索するため、マイクロアレイ、RNAシーケンス、パラフィン切片などによる複数コホートをを用いた解析を行った。複数の遺伝子がステージ2-3症例の術後再発と関連していた。癌間質に発現する遺伝子(群)やタンパクが、特にステージ2の結腸癌症例において再発と関連していた。またいくつかの遺伝子はステージ3症例における癌特異的生存との関連を認めた。本研究では複数のバイオマーカー候補を同定した。さらなる検証が求められている。

研究成果の概要(英文)：Despite the standard treatment with curative surgery and adjuvant chemotherapy, approximately 15-30% of patients with stage II and III colorectal cancer (CRC) will experience disease relapse. We attempted to develop prognostic and predictive biomarkers for postoperative stage II and III CRC that can identify patients with high-risk of recurrence or cancer-death. Using multiple independent cohorts of stage II and III CRC based on microarray, RNA-sequence and immunohistochemistry, we identified several genes that were significantly associated with relapse after surgery. We found that genes and protein expressed by cancer stroma were significantly associated with relapse-free survival in multiple datasets, particularly in stage II colon cancer. Also, some genes were found to be associated with cancer-specific survival in stage III CRC. Collectively, we identified several candidates for the biomarker development for stage II and III CRC, and our finding warrants further investigations.

研究分野：大腸癌

キーワード：大腸癌 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は全がんにおいて死亡・罹患数が最も上位の癌腫のひとつであるが、ここ 10 年で大腸癌診療は飛躍的に進歩している。外科領域においては低侵襲な腹腔鏡手術が標準的となり患者の QOL に貢献している。切除不能・進行再発例に対しては分子標的薬を含む新規薬剤など選択肢が増え、全生存期間の延長に大きく寄与している。急速に変化を遂げつつある大腸癌診療において、個々のがんの特徴に応じた治療の個別化が極めて重要な課題と考えている。

今回、本研究課題が着目するのは外科的切除の対象となる大多数の大腸癌である。本邦では治癒切除後の 5 年生存率は約 80% と比較的良好と言えるが、再発した場合の根治は困難なことが多く、重要なのは根治切除後にいかに再発を回避するかであり、この役割を担うのは術後補助化学療法である。補助化学療法により無病生存期間が延長するという明確なエビデンスが蓄積している。しかしながら恩恵を受け得る患者は一部のみである。本邦では Stage II の約 15%、Stage III の約 30% が再発すると言われるが、多くの患者は手術単独で治癒する可能性がある一方で、標準的な補助療法を行っても再発を来す一定の患者が存在するからである。また化学療法には少なくない副作用と費用が不可避であり患者 QOL および医療経済的に大きな負担である。

大腸癌診療はエビデンスに基づくガイドラインに準拠して行われる、国際標準として術後補助化学療法は Stage III 症例が対象となり、Stage I 症例には推奨されない。Stage II 症例についてはいまだ議論の余地があり、欧米ではいわゆる high-risk Stage II のみが対象とされ、本邦でも high risk と考えられる症例に対し比較的副作用の少ないレジメンを選択することが多い。high-risk Stage II のリスク因子としては深達度や組織型、脈管侵襲、穿孔例などがあるものあくまで参考所見に留まる。しかし Stage II 症例の一部には、Stage III 症例より不良な経過をたどる群があることが知られており、一方で Stage III でも予後の極めて良好な群が存在する。

それゆえ、いま臨床医が求めるのは、術後補助化学療法はどの患者に必要で、どの患者には不要なのか、という個別化のための指針である。具体的には、補助化学療法を含む術後マネジメントの個別化のために、再発リスクの高い 15% の Stage II 症例を抽出すること、そして再発リスクが低く予後良好な 70% の Stage III 症例を識別すること、さらにより強力な介入を行うべき極めて予後不良の Stage II-III 症例を抽出すること、が求められていると言える。

2. 研究の目的

術後再発リスク予測バイオマーカー作成と検証

遺伝子発現レベルからタンパク発現レベルへの応用

特定のゲノム異常に対するバイオマーカーの可能性

バイオマーカー候補分子の生物学的意義の検討

3. 研究の方法

- 公開マイクロアレイデータセットの検索・収集・情報処理
- 各データセットの統合、遺伝子セットの抽出・絞り込み・検証作業
- 福島医大独立コホートの解析
- ゲノム異常に規定されるサブグループに特異的なバイオマーカー作成と検証

4. 研究成果

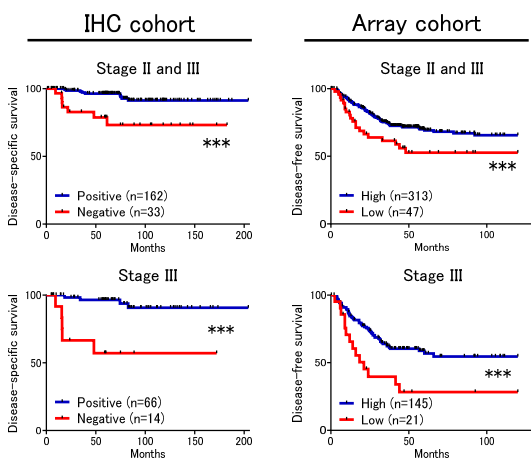
当講座で過去に手術を施行された大腸癌の腫瘍、非腫瘍部サンプルを利用し研究を施行した。なお当該研究はそれぞれ当施設の倫理委員会により承認されている。パラフィン包埋ホルマリン固定標本を用いた免疫染色により候補分子のタンパク発現を癌部・非癌部において評価し、臨床病理学的背景因子や腫瘍学的予後との関連を統計学的に解析した。大腸癌の培養細胞株を用いて候補分子の発現を評価し、ノックダウン実験により癌細胞における遺伝子機能解析を行った。種々の細胞株から RNA、タンパクを抽出し、定量的 RT-PCR、ウエスタンブロット、レクチンマイクロアレイなどを施行した。NCBI の提供する網羅的遺伝子発現データベース (GEO ; Gene Expression Omnibus) や TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースなど、公開されたデータの利用と統計学的解析、バイオインフォマティクスを応用し新規分子マーカー候補遺伝子などを探索した。

(研究成果 1)
網羅的遺伝子プロファイリングを駆使した新規の大腸癌サブタイプ、Stage III 大腸癌の予後マーカー

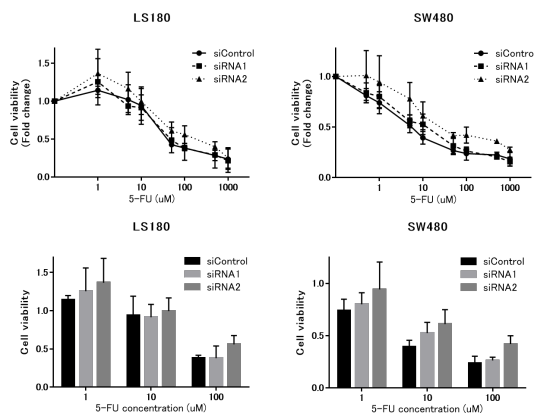
本研究ではまず、TCGA データを含む大規模かつ複数の大腸癌データセットを用いて、網羅的な遺伝子発現解析、クラスター解析を行い、予後不良な群の抽出を試みた。

抽出された予後不良群特徴的なゲノム異常として、既知の BRAF、TP53 などの遺伝子変異、ミスマッチ修復機構の異常などが関連していた。また癌の分化度や局在（右側・左側）といった臨床病理学的な因子とも関連していた。

この予後不良群を特徴づける遺伝子異常の一つとして、Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase ファミリーや Glucosaminyl (N-Acetyl) Transferase ファミリー酵素をコードする遺伝子群の発現異常が抽出された。特に前者は、mRNA およびタンパクレベルにおいて、大腸腺腫で発現し、一部の大腸癌において発現低下ないし消失していることを見出した。またその発現低下はメチル化レベルと相関し、大腸癌細胞株の脱メチル化処理により発現が回復することから、エピジェネティックな発現抑制機構が示唆された。



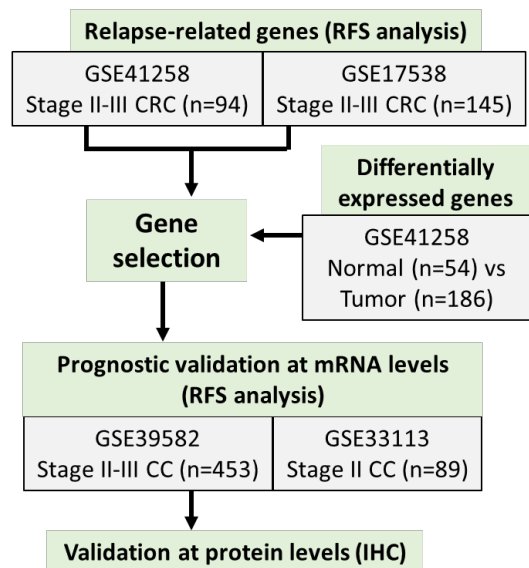
複数のコホート、測定プラットフォームを用いた単変量解析（上図）および多変量解析により、同遺伝子発現は、他の臨床病理学的因子と独立して不良な癌特異的生存、全生存と関連していることが示され、特にステージ症例でその意義が顕著であった（上図下段）。



大腸癌細胞株を用いた、loss-of-function 実験系により、浸潤能、遊走能、5FU 抵抗性などとの関連を認めた（上図）。なお臨床サンプルでも 5FU による術後補助化学療法抵抗性との関連が示唆されている。

したがって発癌早期段階において、エピジェネティックな機構により一部の群では Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 発現が抑制され、癌の進展に寄与しているものと考えられ、大腸癌の予後や治療抵抗性と関連するバイオマーカーとしての意義を示すとともに、癌の進展における重要性を示唆するものである。

（研究成果 2）
特に Stage II 大腸癌における予後マーカー、癌微小環境に着目して

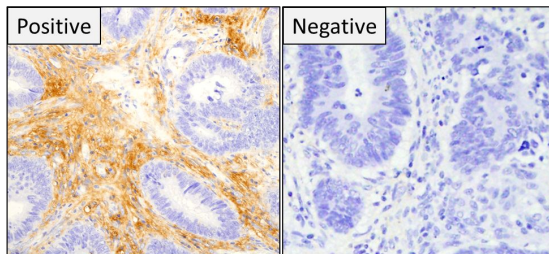


研究のフローチャートを上記に示す。新規バイオマーカーの探求の発端として、GEO から複数のマイクロアレイデータセットをダウンロードし解析に使用した。それぞれ無再発生存期間などの予後情報が付属しているコホートである。まず 2 つの公開マイクロアレイデータセット：GSE41258 および GSE17538 を用いた。なお前者には正常大腸と大腸癌の遺伝子発現情報も含まれている。

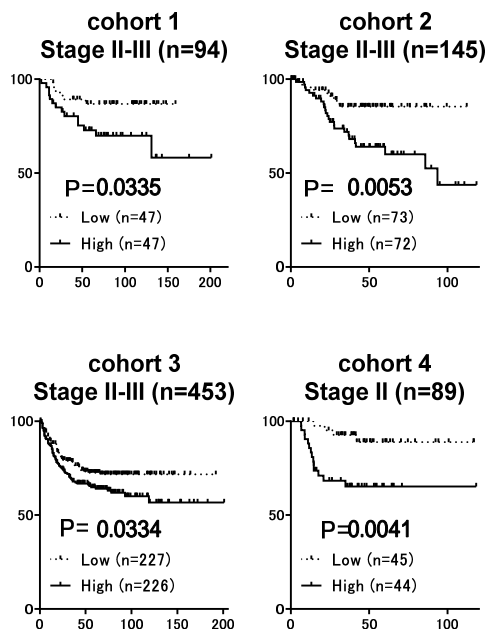
大腸癌特異的に発現変動する遺伝子かつ、2 つの独立したデータセットにおいて大腸癌の無再発生存期間と関連するものを分析し 9 つのマイクロアレイプローブを同定した（次ページ表）。これらプローブが示す遺伝子のいくつかは、コラーゲン線維をコードする遺伝子などが含まれ、主に間質で発現するとされるものであった。

| Affymetrix Probe ID | Cohort 1 | | Cohort 2 | |
|---------------------|-----------------|--------|--------------|-------|
| | Tumor vs Normal | RFS | RFS | RFS |
| | Fold-change | P | Hazard ratio | P |
| 211964_at | 1.340 | <0.001 | 4.649 | 0.006 |
| 211981_at | 1.960 | <0.001 | 3.698 | 0.011 |
| 211571_s_at | 2.670 | <0.001 | 2.846 | 0.032 |
| 211980_at | 1.790 | <0.001 | 2.767 | 0.037 |
| 202627_s_at | 2.910 | <0.001 | 2.759 | 0.038 |
| 203238_s_at | 1.820 | <0.001 | 2.670 | 0.044 |
| 212950_at | 1.240 | <0.001 | 2.648 | 0.046 |
| 207601_at | 0.550 | <0.001 | 0.377 | 0.046 |
| 218272_at | 0.720 | <0.001 | 0.292 | 0.017 |
| | | | 0.369 | 0.008 |

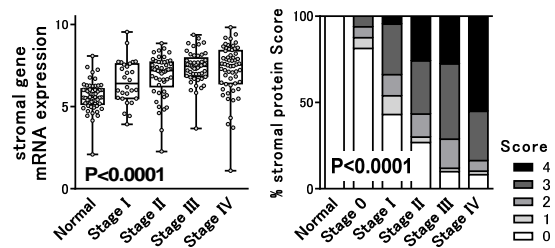
その間質への局在はレーザーマイクロダイセクション法にて大腸癌の上皮成分と間質成分を個別に解析したデータにより確認することができ、さらに免疫染色を用いることで、候補遺伝子がコードするタンパクの発現組織切片上で検討することで検証することができた(下図、左が発現陽性症例)。



再発における意義を独立した公開マイクロアレイデータセットを用いて検証するため、GSE39582 および GSE33113 を用いて解析した。当研究で使用したいずれのコホートにおいても、上述の間質遺伝子発現が術後の無再発生存率と有意に関連していた(下図)。



また、同遺伝子の発現レベルは癌の進展に伴い優位に上昇することがわかった(次ページ図)。



なお症例を層別化し解析を試みたところ、結腸癌については極めて有意に予後と関連する一方、直腸癌においては予後との相関は認めなかった。また特に Stage II 症例における再発における意義が顕著であった。大腸癌、特に結腸癌において間質遺伝子発現が Stage II-III および Stage II 症例術後の予後バイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Noda M, Okayama H, Sakamoto W et al. Glycosyltransferase gene expression identifies a poor prognostic colorectal cancer subtype associated with mismatch repair deficiency and incomplete glycan synthesis. *Clinical Cancer Research*, in press (2018)
2. Onozawa H, Sakamoto W, Takenoshita S et al. Annexin A1 is involved in resistance to 5-FU in colon cancer cells. *Oncology Reports* 37(1):235-240 (2017).
3. Kikuchi D, Sakamoto W, Takenoshita S et al. Upregulated solute carrier family 37 member 1 in colorectal cancer is associated with poor patient outcome and metastasis. *Oncology Letters* 15(2):2065-2072 (2018).
4. Watanabe Y, Sakamoto W, Takenoshita S et al. Upregulated HOXA9 expression is associated with lymph node metastasis in colorectal cancer. *Oncology Letters* 15(3):2756-2762 (2018).
5. Matsumoto Sakamoto W, Takenoshita S et al. Enhanced expression of KIF4A in colorectal cancer is associated with lymph node metastasis. *Oncology Letters* 15(2):2188-2194 (2018)
6. Hayase S, Okayama H, Takenoshita S et al. L-type amino acid transporter 1 expression

is upregulated and associated with cellular proliferation in colorectal cancer. *Oncology Letters*, 14(6):7410-7416 (2017)

7. Momma T, Okayama H, Takenoshita S et al. Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma. *Oncology Letters*, 14(5):5319-5325 (2017)
8. Nakajima T, Okayama H, Takenoshita S, Kono K et al. Augmentation of antibody-dependent cellular cytotoxicity with defucosylated monoclonal antibodies in patients with GI-tract cancer. *Oncology Letters*, 15(2):2604-2610 (2018)
9. Aoto K, Okayama H, Takenoshita S, Kono K et al. *Oncology Reports*, 39(1):151-159 (2018)
10. Chida S, Okayama H, Takenoshita S et al. Stromal VCAN expression as a potential prognostic biomarker for disease recurrence in stage II-III colon cancer. *Carcinogenesis* 37(9):878-887 (2016)
11. 芦澤舞, 岡山洋和, 他. ミスマッチ修復機構欠損を有する大腸癌における microRNA による PD-L1 制御機構. *癌と化学療法*. 44(10):889-891, 2017.
12. 大木進司, 竹之下 誠一, 他. 80 歳以上の高齢者大腸癌におけるリスク評価と予後の解析. *癌と化学療法*. 43(12):1532-1534, 2016.

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 藤田正太郎, 坂本涉, 竹之下 誠一, 他. Stage II 大腸癌における予後予測因子としての inflammatory-based marker の意義, 第 117 回日本外科学会定期学術集会, 2017
2. 岡山洋和, 他. 大腸癌における α 1-6 フコース転移酵素と p53, 第 72 回日本消化器外科学会総会, 2017
3. 芦澤舞, 岡山洋和, 他. ミスマッチ修復機構欠損を有する大腸癌における microRNA による PD-L1 調整機構, 第 72 回日本消化器外科学会総会, 2017
4. 大木進司, 岡山洋和, 坂本 涉, 他. ハイリスク stage II 大腸癌の治療戦略における inflammatory-based marker の意義, 第 79 回日本臨床外科学会総会, 2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹之下 誠一 (TAKENOSHITA, Seiichi)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 1 0 1 6 7 4 8 9

(2)研究分担者

岡山 洋和 (OKAYAMA, Hirokazu)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 2 0 5 8 3 3 9 7

坂本 涉 (SAKAMOTO, Wataru)
福島県立医科大学・医学部・助教
研究者番号 : 4 0 6 2 2 3 3 7